

氏 名	劉 哲
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第5416号
学位授与の日付	平成28年 9月30日
学位授与の要件	環境生命科学研究科農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Tea catechins as potent non-competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme (アンジオテンシン変換酵素の強力な非競合阻害剤としての茶カテキン)
論文審査委員	教授 村田 芳行      教授 中村 宜督      教授 木村 吉伸

### 学位論文内容の要旨

Angiotensin converting enzyme (ACE) is an important member of renin-angiotensin system. The inhibition of ACE is one of the most effective strategies for the treatment of hypertension. Tea catechins, the major biologically active components of tea, have been reported to inhibit the enzymatic activity of ACE. However, the precise molecular mechanisms remain to be clarified.

First, the inhibitory effects of four tea catechins, including (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECg) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCg), on the enzymatic activity of ACE (purified from rabbit lung) were compared. Each catechin treatment significantly reduced the ACE activity with the order of potency being EGCg > ECg > EGC = EC. The addition of 1 mM borate significantly recovered the reduced ACE activities by tea catechins. A Lineweaver-Burk plot indicated that EGC and ECg were non-competitive inhibitors. The galloylated catechins might more potently inhibit ACE activity in an allosteric manner through the hydrophobic and hydrogen-bonding interaction of the galloyl moiety with the non-catalytic site of ACE.

Second, the molecular mechanisms involved in the ACE inhibition by EGCg, a major tea catechin, were investigated. Co-incubation with  $Zn^{2+}$  ion showed no influence on the ACE inhibition by EGCg. Although a considerable amount of hydrogen peroxide was produced during the incubation of EGCg, the treatment of ACE with hydrogen peroxide showed little effect on its enzymatic activity. On the other hand, the co-incubation of EGCg with inhibitors of catechol oxidation, such as borate or ascorbic acid, significantly diminished the EGCg inhibition. A redox-cycling staining experiment revealed that ACE was covalently modified by EGCg. Furthermore, a Lineweaver-Burk plot analysis indicated that EGCg also inhibited the ACE activity in a non-competitive manner. These results strongly suggested that EGCg allosterically inhibits the ACE activity through the oxidative conversion into an electrophilic quinone and subsequent binding to the ACE.

Third, the modulating effect of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), a colonic microflora-produced catabolite of polyphenols, on ACE activity was studied. The co-incubation of DOPAC significantly inhibited the enzymatic activity of ACE in a dose-dependent manner. The covalent binding of DOPAC with ACE was detected by a tag-free DOPAC probe with the azide labeled biotin and a horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin complex. These findings suggested that ACE is one of the potential cellular targets of DOPAC.

In conclusion, this study indicates that the galloylated catechins (ECg and EGCg) allosterically inhibit the ACE activity through the interaction with the non-catalytic site of ACE, associated with more potent ACE inhibitory activity. This study also suggests that the galloylated catechins could be potential candidates to develop nutraceuticals against hypertension and its related disease.

## 論文審査結果の要旨

アンジオテンシン変換酵素（ACE）は、アンジオテンシン I を血管収縮に関わるアンジオテンシン II に変換する反応を触媒するメタロプロテアーゼであり、この活性制御は高血圧だけでなく心血管疾患の治療・予防の有望な一戦略として注目されている。一方、ポリフェノールなどの植物性食品因子は高い健康維持機能を持つことから、社会的に注目が集まっている。しかし、ポリフェノールがACEに与える影響やその分子機構については未だ不明な点が多い。そこで本論文では、高血圧や心血管疾患に対する予防剤としてのポリフェノールの生物学的根拠を得る目的で、1) 緑茶カテキン類のACE活性阻害作用の比較、2) 主要な緑茶カテキンであるエピガロカテキンガレート（EGCg）のACE活性阻害機構の解明、3) ポリフェノール腸内細菌異化物である3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸（DOPAC）の共有結合修飾を介したACE活性阻害作用を明らかにしようとしている。

まず、緑茶カテキン類のACE酵素活性に対する影響を調べた結果、没食子酸エステル基を有するカテキン類が強力な阻害作用を示すことを見出した。また、緑茶カテキンの一種であるEGCgは、ACEの活性中心に存在する亜鉛イオンへのキレート作用や過酸化水素の生成を介さず、没食子酸エステル基とACEとの相互作用を介したアロステリック調節機構により、ACE酵素活性を非競合的に阻害することを明らかにした。さらに、DOPACのタグフリープローブとClick Chemistryを用いた解析から、DOPACとACEが共有結合することを明らかにし、この化学的特性がACE活性阻害に大きく寄与することを示した。

本研究内容は、学術的な価値のみならず、実用に結びつく技術の礎となるものであり、本審査委員会は、本論文が博士（学術）の学位論文に値するものと判断した。